



KONGERIKET NORGE  
The Kingdom of Norway

Bekreftelse på patentsøknad nr  
*Certification of patent application no*

1999 6334

► Det bekreftes herved at vedheftede dokument er nøyaktig utskrift/kopi av ovennevnte søknad, som opprinnelig inngitt 1998.12.23

► *It is hereby certified that the annexed document is a true copy of the above-mentioned application, as originally filed on 1998.12.23*

2003.07.17

*Freddy Strømmen*

Freddy Strømmen  
Seksjonsleder

*Line Reum*

Line Reum



PATENTSTYRET®  
Styret for det industrielle rettsvern

1/b

PATENTSTYRET

20.DES99 996334

20 DES. 1999

EK/KBN

17.12.99

E10511

UTSKILT FRA SØKNAD nr. 19986133 av 23/12-1998

Preben Lexow  
Fløensbakken 41A  
5009 Bergen

Oppfinner:

Søkeren

**Metode for sekvensanalyse**

Foreliggende oppfinnelse er utskilt fra patentsøknad 19986133 som omfatter en metode for DNA-sekvensering som inneholder følgende trinn:

Første trinn tar utgangspunkt i en ren DNA-populasjon bestående av DNA-sekvensen som skal sekvenseres. DNA-molekylene kuttet/brekkes på en uspesifikk måte slik at det dannes en populasjon med DNA-molekyler bestående av biter (heretter kalt DNA-biter) av den opprinnelige sekvensen.

Annet trinn består i å erstatte baseparene i DNA-bitene med 4 ulike DNA-sekvenser (heretter kalt DNA-fragmenter) som representerer hver av de fire basene adenin, cytosin, guanin og tymin. Der hvor det har vært basepar A-T, settes det altså inn "fragment A", C-G byttes ut med "fragment C" osv. Dermed genereres nye DNA-molekyler hvor den opprinnelige baserekkefølgen på f.eks. ACGTT... erstattes med fragment A - fragment C - fragment G osv. Lengden på disse fire DNA-fragmentene kan i prinsippet variere i lengde fra 2bp til flere hundre kbp (eller mer om ønskelig), alt etter behov. Tilsvarende kan DNA-fragmentene inneholde reportergener og annen biologisk informasjon eller kun bestå av sekvenser uten kjent biologisk funksjon.

I tredje trinn avleses rekkefølgen av de fire typene DNA-fragmenter for hvert enkelt DNA-molekyl. Dermed finner man baserekkefølgen i de opprinnelige DNA-bitene indirekte.

I fjerde trinn benytter et dataprogram overlappen mellom DNA-bitene til å sette sammen informasjonen fra trinn 3 til sekvensen på DNA-sekvensene som ble brukt som utgangspunkt.

Foreliggende oppfinnelse omhandler en måte for å "forstørre" DNA.

### Metode for å «forstørre DNA»:

Et sentralt poeng med analysemetodene i patentsøknad nr. 19986133 er at DNA molekylene «forstørres» slik at de blir lettere å analysere. Et alternativ til de forstøringsstrategiene som er omtalt tidligere er å la DNA molekyler fordoble seg. Hvis man f.eks. har en løsning med 3 DNA molekyler på hhv 10, 11 og 12bp og lar disse fordoble seg 10 ganger får man en løsning med DNA molekyler på omlag 10.000, 11.000 og 12.000bp. Med de fleste metoder som brukes for å analysere DNA er det lettere å observere forskjellen på DNA molekyler som skiller seg med 1000bp hver enn de som skiller seg med 1bp selv om den relative størrelsesforskjellen er den samme. Prinsippet om å fordoble DNA kan derfor brukes til å forbedre de fleste DNA analyse metoder.

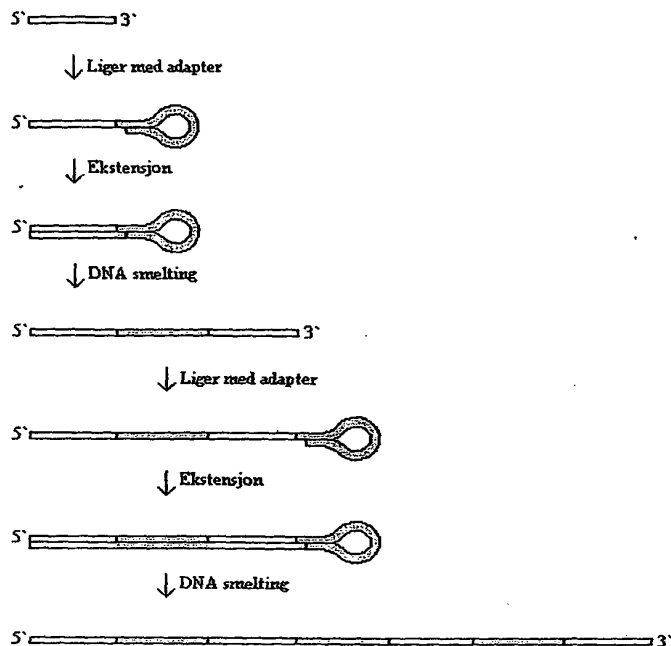
Hvis man ved hjelp av metoden som er illustrert i figur 1 fordobler et DNA molekyl på x bp n ganger ved hjelp av en adapter som er y bp lang vil DNA molekylets lengde bli;

$$1) \quad x \cdot 2^n + (2^n - 1)y$$

Forskjellen mellom to DNA molekyler som var på hhv x og x+1 bp før fordoblingene blir dermed;

$$2) \quad (x+1) \cdot 2^n + (2^n - 1)y - x \cdot 2^n + (2^n - 1)y = 2^n$$

Lengdeforskjellen mellom to fordoblede DNA molekyler er derfor kun bestemt av deres absolutte og ikke deres relative lengdeforskjeller før fordoblingene. Etter 10 fordoblinger vil f.eks vil lengdeforskjellen mellom DNA molekyler på 4 og 5 bp være den samme som mellom DNA molekyler på 12000 og 12001 bp, nemlig  $2^{10} = 1024$ bp. Dette er et viktig poeng som gjør at metoden kan brukes til å lage «DNA stiger» hvor lengdeforskjellen mellom hvert trinn er den samme. Metoden kan derfor brukes til å forbedre de fleste metoder som er basert på å detektere størrelsesforskjeller på DNA molekyler. Både gel og non-gel baserte. I tillegg kommer at fordoblingsstrategien gjør det mulig å analysere DNA med teknikker som ikke er sensitive nok til å registrere forskjeller på noen få basepar. Nedenfor følger noen eksempler på hvordan dette kan utnyttes



**Fig 1. Metode for å fordoble DNA.** Figuren viser to fordoblingssykluser av et enkeltrådig DNA molekyl. Fordoblingene innledes med å ligere en hairpin adapter til molekylets 3'ende. På samme måte som f.eks. reverse transkriptase bruker en 3' hairpin loop som primer kan adapteren brukes som primer for en polymerase som eksterender molekylet. Til slutt smeltes DNA molekylet slik at man er tilbake til utgangspunktet. En rekke andre teknikker kan også tenkes for å «fordoble» DNA molekyler.

#### Forbedret Maxam Gilbert metode:

En løsning med et enkelttrådig DNA molekyl på f.eks. 1000 bp blir biotinmerket i 5'enden og fordelt på fire streptavidindekte plater. De streptavidindekte platene står rettvisklet på hver sin avlesningsplate og er kun noen få mikrometer høye. Til de fire platene tilsettes kjemikalier som kutter hhv adenin, cytosin, guanin og thymin (på samme måte som ved Maxam-Gilbert sekvensering). platene vaskes og molekylerne fordobles deretter 10 ganger slik at det lages «DNA-stiger» med trinn på 1024bp. Deretter gjøres DNA molekylerne dobbelttrådig samtidig som de endermerkes med fluorescens. Til endermerkingen kan man f.eks. bruke en fluorescerende mikrosfære eller et fluorescerende DNA fragment. DNA molekylerne rettes deretter ut ved hjelp av en væskestrøm, elektrisk felt eller annet. Fluorescensen fra de utrettede DNA molekylerne kan deretter registreres med en fluorescens scanner. Ved å måle avstanden mellom fluorescenssignalene og den streptavidindekte platen får man informasjon om hvor de 4 ulike basene befinner seg. Dermed kan man utlede DNA sekvensen.

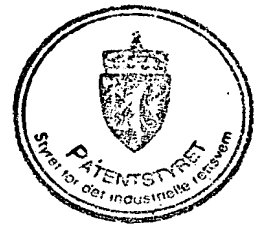
#### Anvendelse av adaptere og DNA chips:

DNA sekvensen som ønskes sekvensert amplifiseres opp ved hjelp av PCR og hybridiseres deretter til komplementære oligonukleotider på en DNA chips. DNA chipsen står rettvisklet på en avlesningsplate og er kun noen få mikrometer høy. Oligonukleotidene brukes deretter som primere for en PCR reaksjon hvor mål DNA'en fungerer som templat slik at det dannes dobbelttrådig mål DNA. Denne behandles deretter på samme måte som illustrert i fig.1 i

vedlegg innsendt 21/3-1999. Hvis adapterene har fragmenter med samme størrelse som trinnene i «DNA stigen» (1024bp) får man en kontinuerlig, fluorescerende DNA stige som kan avleses med en fluorescens scanner når man retter ut DNA molekylene ved hjelp av en væskestrøm, elektrisk felt eller lignende. Med denne metoden er det mulig å lage mange tusen pixler på samme avlesningsplate slik at man kan sekvensere mange tusen DNA sekvenser på samme avlesningsplate.

#### Andre metoder:

Metodene ovenfor er kun ment som eksempler på hvordan prinsippet med å «fordoble» DNA kan brukes til å forbedre eller utvikle nye DNA analyse metoder. Det er derfor viktig å understreke at fordoblingsprinsippet kan brukes i svært mange sammenhenger.



## P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for sekvensanalyse, k a r a k t e r i s e r t v e d  
beskrivelsen.



1e

PATENTSTYRET

20.DES99 996334

20 DES. 1999

O. nr. E10511

Sammendrag

Fremgangsmåte for sekvensanalyse.

